PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
A61K 35/74, 39/39

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 96/00579**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Januar 1996 (11.01.96)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02524

(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 1995 (29.06.95)

(30) Prioritätsdaten:
P 44 22 859.7 30. Juni 1994 (30.06.94) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: LAVES-ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Barbarastrasse 14, D-30953 Ronnenberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: LAVES, Hans-Georg [DE/DE]; Barbarastrasse 14, D-30953 Ronnenberg (DE). THOMSEN, Anne [DE/DE]; Nienburgerstrasse 12, D-30167 Hannover (DE).

(74) Anwalt: HARMSEN, UTESCHER & PARTNER; Adenauerallee 28, D-20097 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, CA, CZ, JP, KR, NO, PL, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: AQUEOUS CELL EXTRACTS AND AQUEOUS SUSPENSIONS OF CELL WALL FRACTIONS FROM MYCOBACTERIA

(54) Bezeichnung: WÄSSRIGE ZELLEXTRAKTE UND WÄSSRIGE SUSPENSIONEN VON ZELLWANDFRAKTIONEN AUS MYKOBACTERIEN

(57) Abstract

The invention relates to aqueous extracts of not usually human-pathogenic mycobacteria, in which the extracts give an increase in the cytokinene IL-1 and IL-6 content in the ratio of 1:6 or 1:1.25 respectively according to the j.Immunol. 120:2027-2032 cyto-test, with a change in concentration of 1 to 4 to 1 to 16.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft wäßrige Extrakte aus in der Regel nicht menschenpathogenen Mykobacterien, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die Extrakte im Cytokintest nach J.Immunol. 120:2027-2032 bei einer Konzentrationsänderung von 1 auf 4 auf 1 auf 16 eine Erhöhung des Gehaltes an Cytokinen IL-1 und IL-6 im Verhältnis von 1:6 bzw. 1:1,25 ergeben.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Wässrige Zellextrakte und wässrige Suspensionen von Zellwandfraktionen aus Mykobacterien.

Die Erfindung betrifft wässrige Extrakte und wässrige Suspensionen von Zellwandfraktionen aus in der Regel nicht menschenpathogenen Mykobacterien.

Es ist bekannt, daß Mykobacterium tuberculosis in der Varietät hominis und Mykobacterium leprae humanpathogen sind, aber daneben gibt es eine ganze Reihe Mykobacterien, die in der Regel nur tierpathogen sind; für viele Säugetiere ist beispielsweise Mycobacterium tuberculosis var. bovis pathogen und für Vögel ist Mycobacterium avium ein Krankheitserreger. Allerdings hat sich herausgestellt, daß gelegentlich in seltenen Fällen bei Menschen mit stark angegriffenem Immunsystem auch Infektionen mit an und für sich nur tierpathogenen Mykobacterien zu beobachten sind. Es ist auch bekannt, daß sowohl die Proteine als auch die verschiedenen Lipoidfraktionen der Mykobacterien antigenen Charakter haben, während die Polysacharide wahrscheinlich nur als Haptene im Sinne von Halbantigenen funktionieren. Es ist des weiteren bekannt, daß Tuberkelbakterien, die in einen Wirtsorganismus eindringen, der im Sinne einer durchgemachten Infektion schon zuvor mit Mykobacterien Kontakt hatte, eine Allergie auslösen, also eine immunologisch bedingte spezifisch veränderte Reaktionsbereitschaft. Der Zustand der Allergie gegen Tuberkelbakterien wird durch intrakutane Injektion von Tuberkulin geprüft; Tuberkulin besteht aus gelösten Zerfallsprodukten von Tuberkelbakterien. Mit der Tuberkulinprobe kann also abgeklärt werden, ob ein Wirtsorganismus gegenüber Tuberkelbazillen allergisch ist oder nicht. Ein allergischer Organismus reagiert viel rascher auf eine natürliche Infektion und vermag diese demzufolge eher einzudämmen als ein nicht allergischer Organismus. Diese Tatsache macht man sich zu nutze, um durch eine unspezifische Modulation der Immunfunktionen eine Fehlfunktion oder eine verzögerte Reaktionsbereitschaft des Immunsystems zu korrigieren.

Bei der Immunantwort des Körpers spielen Cytokine wie IL-1 und IL-6 eine zentrale Rolle in der Regulation, Proliferation und Differenzierung von Immunzellen. Eine unspezifische Modulation der Immunfunktion entsteht im wesentlichen durch eine Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen, die daraufhin Cytokine im verstärkten Maße freisetzen.

ORIGINAL UNTERLAGEN

Die Interleukinforschung befindet sich zwar noch im Stadium des Experiments, aber zwischenzeitlich ist bekannt, daß Interleukin 1 eine Steigerung der PHA-induzierten Lymphozytenproliferation, Fibroplastenproliferation und eine Aktivitätssteigerung von natürlichen Killerzellen in Anwesenheit von IFN verursacht. Das Gleiche trifft im wesentlichen für Interleukin 6 zu, das ebenfalls eine Aktivitätssteigerung von natürlichen Killerzellen und eine T-Zellproliferation bedingt. Versuchsweise werden die Interleukine daher bei der Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren wie zur Substitution bei T-Zelldefekten eingesetzt. Interleukin 2 wird beispielsweise mit Erfolg bei metastasierenden Nierenkarzinomen klinisch eingesetzt und die zu den Cytokinen zählenden Interferon-δ und Interferon-α 2B haben Erfolge bei rheumatoider Arthritis bzw. Haarzellenleukämie gebracht. Seit kurzem wird auch der granulocytenkolonie-stimulierende Faktor G-CSF bei Leukopenien von Patienten mit vorangegangener myelosuppressiver Chemotherapie in der Klinik angewendet. Neben den isolierten Cytokinen finden aber auch Substanzen therapeutische Anwendung, die das Immunsystem unspezifisch stimulieren bzw. modulieren durch eine Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen, die daraufhin Cytokine wie IL-1 und IL-6 freisetzen.

Es besteht daher immer noch ein starkes Bedürfnis nach Substanzen, die in der Lage sind eine unspezifische Immunmodulation erzeugen zu können, da durch eine erhöhte Freisetzung von Cytokinen und Interferonen eine ganze Reihe von Krankheiten bzw. deren Begleitsymptome therapeutisch beeinflußbar sind.

Erfindungsgemäß werden daher wässrige Extrakte bzw. wässrige Suspensionen von Zellwandfraktionen von in der Regel nicht humanpathogenen Mykobacterien mit den Merkmalen der Ansprüche 1 und 2 vorgeschlagen.

Als in der Regel nicht humanpathogene Mykobacterien können unter anderem eingesetzt werden M. tuberculosis var. bovis, M.avium, M.kansasii, M. marinum, M. scrofulaceum, M. intercellulare, M. xenopi, M. fortuitum und M. chelonae ssp.chelone. Diese Stämme sind als solche bekannt und können beispielsweise aus der umfassenden Londoner Stammsammlung des Centre for Public Health Laboratory, National Collection of Type Cultures bezogen werden. Dieses Institut informiert auch über die Kulturbedingungen der jeweiligen Spezies bzw. Subspezies.

Die erfindungsgemäß hergestellten Extrakte bzw. Suspensionen haben sich in den ersten klinischen Prüfungen als wirksame Immunmodulatoren erwiesen und können beispielsweise als unterstützende Therapie bei Infektionskrankheiten, neoplastischen Erkrankungen, Asthma bronchiale, Allergien unbekannter Genese und rheumatoider Arthritis eingesetzt werden.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1:

Herstellung des Extraktes bzw. der Zellwandfraktionen

Für die Herstellung des wässrigen Extraktes bzw. der Zellwandfraktion werden 250 ml Flüssigkeitsmedium aus 5 g/Liter Natriumchlorid, 14 g/Liter Pepton, 7 g/Liter $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 2 g/Liter KH_2PO_4, 3 % Glycerin (85%) mit einer Bakterienöse mit einer Mykobacteriengebrauchskultur beimpft und 4 Wochen bei 35 ° C bebrütet. 4,5 g Bakterienfeuchtmasse werden über eine sterile Nutsche mit Glasfritte filtriert und anschließend homogen verrieben. Nach Zugabe von 100 ml sterilisierter isotonischer Natriumchloridlösung beträgt die Keimzahl $9,7 \times 10^6$ KBE pro ml.
Die resuspendierten Bakterienzellen werden bei 12.000 RPM 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird mit Glasperlen trocken vermengt, wiederum in Natriumchloridlösung aufgenommen und mit einer Vibrogen-Zellmühle bei 4 °C 20 Minuten zerschlagen. Nach Abnutschen über eine Glasfritte und einer Zugabe von 3 Tropfen eines Antischaummittels erfolgt eine erneute Zentrifugation (18.000 RPM, 20 Minuten). Der gewonnene Überstand dient der Herstellung des Mykobacterien-Extraktes, das Pellet der Herstellung der Zellwandfraktion.

Bei der Weiterverarbeitung zum Extrakt werden 43 ml des Überstandes 20 Minuten bei 121° C autoklaviert und bei 4° C gelagert. Es folgt eine Filtration über Tiefenfilter (EKS) und eine Sterilfiltration (Sterilfilter mit Porengröße 0,54 µm). Abschließend wird der filtrierte Extrakt 2 Stunden bei 80° C im Wasserbad gehalten.

Zur Gewinnung der Zellwandfraktion wird das Pellet in 27 ml isotonischer Natriumchloridlösung resuspendiert.

Beispiel 2:

Versuche zur Quantifizierung der Cytokininduktion

Bei diesen Versuchen wird auf eine Reihe von Veröffentlichungen Bezug genommen; die in Klammern gesetzten Ziffern beziehen sich auf die beigefügte Literaturliste.

Zellextrakt und Zellwandfraktion zeigen in einer dosisabhänigen Reaktion eine signifikante Induktion der Cytokine Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). Cytokine sind lebensnotwendige Botenstoffe, die zwischen den Zellen, u.a. den Zellen des Immunsystems vermitteln.

IL-1 und IL-6 sind pleiotrope Cytokine, die von verschiedenen Zellen produziert werden und eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr und der Hämatopoese einnehmen. Sie bewirken eine Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen (immunmodulierende Wirkung), die Regulation der Akutphase-Proteine durch die Leber im Rahmen eines Entzündungsprozesses (antiinflammatorische Wirkung) sowie die Stimulation der koloniebildenden Zellen für Megakaryozyten und Megakaryozyten selbst (Regulation der Hämatopoese). Außerdem induziert IL-1 die Synthese anderer Lymphokine wie IL-4, IL-5 und IL-6.

Isolierung von mononukleären Zellen:
Heparinisiertes Blut aus gesunden Spendern wurde mit Hilfe einer Gradientenzentrifugation über Ficoll isoliert, mehrere Male gewaschen und in serumfreiem RPMI 1640 (1) mit L-Glutamin und Antibiotika inkubiert. Zur Cytokinproduktion (2) wurden die verschiedenen Stimuli 24 Stunden mit den Zellen inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit Schutzprotein versehen, bei -20° C aufbewahrt und anschließend im entsprechenden Cytokin-Test untersucht.

Isolierung von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen:
Endothel- und glatte Muskelzellen (EC und SMC) wurden aus Stücken der Vena saphena isoliert, die bei Bypass-Operationen nicht verwendet werden konnten. EC wurden durch Kollagenase-Behandlung (3) und SMC durch eine Auswuchstechnik (4) isoliert. Die Zellen wurden in M199, ECGF und Heparin bzw. DMEM mit 10 % FCS, L-Glutamin und Antibiotika (5, 6, 7) inkubiert. Zur Cytokinproduktion wurden die verschiedenen Stimuli 24 Stunden mit den Zellen inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit Schutzprotein versehen, bei -20° C aufbewahrt und anschließend im entsprechenden Cytokin-Test untersucht.

7TD1-Assay zum Nachweis von IL-6:
Die oben erwähnten Überstände von monoukleären und vaskulären Zellen wurden in 96 Loch Kulturplatten in 8 bis 12 Stufen verdünnt. Zu diesen Verdünnungsreihen wurden 2.000 Zellen/Loch der IL-6-abhängigen murinen B-Zellinie 7TD1 (8) hinzugefügt, ähnlich wie für B9-Zellen beschrieben. Die Kulturen wurden 72 Stunden inkubiert, für weitere 6 Stunden mit radioaktivem Thymidin versehen und die Proliferation der Zellen durch Messung der eingebauten Radioaktivität ermittelt. Die Aktivität der Proben wurde durch Vergleich der Proben mit einem definierten Standard mit Hilfe der Probit-Analyse (9) ermittelt.

Fibroblasten-Assay zum Nachweis von Interleukin-1:
Fibroblasten wurden in 96 Loch Platten kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und Proben in Verdünnungsreihen zu den Fibroblastenkulturen hinzugefügt. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit radioaktivem Thymidin versehen und nach weiteren 24 Stunden ausgewertet wie für 7TD1 Zellen beschrieben.

Ergebnisse:

Der Extrakt induziert dosisabhängig IL-1 (pg/ml) wie folgt:
Konzentration 1 : 4 : 206 pg/ml; 1 : 16 : 1.250 pg/ml; 1 : 64 : 947 pg/ml; 1 : 1.024 : 625 pg/ml

Der Extrakt induziert dosisabhängig IL-6 (pg/ml) wie folgt:
Konzentration 1 : 4 : 95.082 pg/ml; 1 : 16 : 118.447 pg/ml; 1 : 64 : 76.326 pg/ml; 1 : 1.024 : 51.961 pg/ml

Die Zellwandfraktion induziert dosisabhängig IL-1 (pg/ml) wie folgt:
Konzentration 1 : 4 : 103 pg/ml; 1 : 16 : 1.649 pg/ml; 1 : 64 : 1.539 pg/ml; 1 : 1.024 : 54 pg/ml

Die Zellwandfraktion induziert dosisabhängig IL-6 (pg/ml) wie folgt:
Konzentration 1 : 4 : 2.013 pg/ml; 1 : 16 : 41.711 pg/ml; 1 : 64 : 35.374 pg/ml; 1 : 1.024 : 19.331 pg/ml

Literatur

1. Loppnow, H., H. Brade, I. Dürrbaum, C. A. Dinarello, S. Kusumoto, E. T. Rietschel and H.-D. Flad. 1989. IL1 induction capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. J. Immunol. 142: 3229 - 3238.

2. Loppnow, H., H. Brade, E. T. Rietschel and H.-D. Flad. 1994. Induction of cytokines in mononuclear and vascular cells by endotoxin and other bacterial products. *In*: Virginia L. Clark and Patrik M. Bavoil (eds.), Methods in Enzymology; Bacterial pathogenesis, Part B; Interaction of pathogenic bacteria with host cells. Academic Press, Orlando. In press.

3. Jaffe, E. A., R. L. Nachmann, C. G. Becker and C. R. Minick. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J. Clin. Invest. 52: 2745 - 2756.

4. Ross, R. and B. Kariya. 1980. Morphogenesis of vascular smooth muscle in atherosclerosis and cell structure. *In*: "Handbook of Physiology" The Cardiovascular System, Section 2. (D. F. Bohr, A. P. Somlyo and H. Y. Sparks, eds.), American Physiological Society, Bethesda. p. 66 - 91.

5. Loppnow, H. and P. Libby. 1989. Adult human vascular endothelial cells express the IL6 gene differentially in response to LPS or IL1. Cell. Immunol. 122: 493 - 503.

6. Loppnow, H. and P. Libby. 1990. Proliferating or Interleukin 1-activated Human Vascular Smooth Muscle Cells Secrete Copious Interleukin 6. J. Clin. Invest. 85: 731 - 738.

7. Loppnow, H. and P. Libby. 1992. Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin 1 in paracrine and autocrine regulation pathways. Exp. Cell Res. 198: 283 - 290.

8. Van Snick, J., S. Cayphas, A. Vink, C. Uyttenhove, P. G. Coulie, M. R. Rubira and R. J. Simpson. 1986. Purification and NH_2-terminal amino acid sequence of a T-cell derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9679 - 9683.

9. Gillis, S., M. M. Ferm, W. Ou and K. A. Smith. 1978. T-cell growth factor: parameters for production and a quantitative microassay for activity. J. Immunol. 120: 2027 - 2032.

Patentansprüche

1. Wässriger Extrakt aus in der Regel nicht menschenpathogenen Mykobakterien, dadurch gekennzeichnet, daß der Extrakt im Cytokintest nach J. Immunol. 120 : 2027 - 2032 bei einer Konzentrationsänderung von 1 : 4 auf 1 : 16 eine Erhöhung des Gehaltes an Cytokinen IL-1 und IL-6 im Verhältnis von 1 : 6 bzw. 1 : 1,25 ergibt.

2. Wässrige Suspension von Zellwandfraktionen von in der Regel nicht humanpathogenen Mykobakterien, dadurch gekennzeichnet, daß diese Fraktionen im Cytokintest nach J. Immunol. 120 : 2027 - 2032 bei einer Konzentrationsänderung von 1 : 4 auf 1 : 16 IL-1 und IL-6 Cytokine im Verhältnis von 1 : 16 bzw. 1 : 20 induzieren.

3. Verfahren zur Herstellung eines wässrigen Extraktes bzw. einer wässrigen Suspension von Zellwandfraktionen von in der Regel nicht menschenpathogenen Mykobakterien, dadurch gekennzeichnet, daß die Mykobakterien 4 Wochen bei 35 ° Celsius auf einem Peptonagar bebrütet, vom Nährmedium abfiltriert, in isotonischer Kochsalzlösung resuspendiert und dann 20 Minuten bei 12.000 RPM zentrifugiert, das Sediment in Kochsalzlösung aufgenommen und bei 4 ° Celsius in einer Zellmühle zermahlen und erneut 20 Minuten bei 18.000 RPM zentrifugiert und der Überstand abgetrennt, autoklaviert und sterilfiltriert und anschließend bei 80 ° Celsius für eine Zeitspanne von 2 Stunden gehalten wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr ıal Application No
PCT/EP 95/02524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K35/74 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB,A,2 015 876 (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 1979 see page 1, line 58 - page 3, line 57; examples 1-5	1,3
X	US,A,3 172 815 (FOX A.E.) 1965 see column 1, line 36 - line 46; examples 1-4	2
X	WO,A,87 02249 (RAGLAND W.L.) 1987 see the whole document	2

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 October 1995	08. 11. 95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Fernandez y Branas,F

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 120, no. 6, 1978 BALTIMORE US, pages 2027-2032, STEVEN GILLIS ET AL 'T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity' cited in the application see the whole document	1-3
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 149, no. 2, 1992 BALTIMORE US, pages 541-547, BARNES, P.F. ET AL 'Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan' see the whole document	1-3

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter ..al Application No
PCT/EP 95/02524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
GB-A-2015876	19-09-79	JP-C-	1432436	24-03-88
		JP-A-	54140710	01-11-79
		JP-B-	62041214	02-09-87
		CA-A-	1146467	17-05-83
		DE-A-	2908241	13-09-79
		DE-C-	2954387	09-10-86
		FR-A,B	2419071	05-10-79
		US-A-	4726947	23-02-88
US-A-3172815	09-03-65	NONE		
WO-A-8702249	23-04-87	US-A-	4744984	17-05-88
		AU-B-	605116	10-01-91
		AU-B-	6525886	05-05-87
		CA-A-	1293190	17-12-91
		DE-A-	3684305	16-04-92
		EP-A,B	0238657	30-09-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 95/02524

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K35/74 A61K39/39

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB,A,2 015 876 (MITSUI TOATSU CHEMICALS) 1979 siehe Seite 1, Zeile 58 - Seite 3, Zeile 57; Beispiele 1-5	1,3
X	US,A,3 172 815 (FOX A.E.) 1965 siehe Spalte 1, Zeile 36 - Zeile 46; Beispiele 1-4	2
X	WO,A,87 02249 (RAGLAND W.L.) 1987 siehe das ganze Dokument	2

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
9.Oktober 1995	08. 11. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Fernandez y Branas,F

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 120, Nr. 6, 1978 BALTIMORE US, Seiten 2027-2032, STEVEN GILLIS ET AL 'T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-3
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 149, Nr. 2, 1992 BALTIMORE US, Seiten 541-547, BARNES, P.F. ET AL 'Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis Lipoarabinomannan' siehe das ganze Dokument	1-3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen
PCT/EP 95/02524

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
GB-A-2015876	19-09-79	JP-C-	1432436	24-03-88
		JP-A-	54140710	01-11-79
		JP-B-	62041214	02-09-87
		CA-A-	1146467	17-05-83
		DE-A-	2908241	13-09-79
		DE-C-	2954387	09-10-86
		FR-A,B	2419071	05-10-79
		US-A-	4726947	23-02-88
US-A-3172815	09-03-65	KEINE		
WO-A-8702249	23-04-87	US-A-	4744984	17-05-88
		AU-B-	605116	10-01-91
		AU-B-	6525886	05-05-87
		CA-A-	1293190	17-12-91
		DE-A-	3684305	16-04-92
		EP-A,B	0238657	30-09-87

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☑ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.